

## 学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 4 3 4 号	学位授与年月日	平成 1 9 年 1 月 1 9 日
氏 名	三 河 須美子		
論文題目	Bone morphogenetic protein-4 expression in the adult rat brain (成体ラット脳における bone morphogenetic protein-4 の発現について)		

博士(医学) 三 河 須美子

## 論文題目

Bone morphogenetic protein-4 expression in the adult rat brain

(成体ラット脳におけるbone morphogenetic protein-4の発現について)

## 論文の内容の要旨

〔はじめに〕

Bone morphogenetic protein-4 (BMP4) は骨形成因子の一つで、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) スーパーファミリーに属し、分化、増殖および様々な細胞機能を調節することが知られている。BMP4は、はじめに大きな前駆体として合成された後に、細胞内でプロセッシングを受け、成熟タンパクとなる。BMP4の受容体としては、タイプ I (BMPRIA, BMPRIB) およびタイプ II が存在し、それぞれのサブユニットはセリン/スレオニンキナーゼ領域を持っている。BMP4が結合すると、タイプ II BMPレセプターはタイプ I BMPレセプターをリン酸化して活性化し、タイプ I BMPレセプターはSmadファミリータンパクをリン酸化することにより細胞内へシグナルを伝達する。BMP4には、競合的アンタゴニスト (noggin、chordin、follistatin、neurogenesin-1) が存在し、これらによってもその機能の調節を受けている。発生初期における神経系の誘導には、これらのアンタゴニストがBMP4の作用を調節することが必須であることはよく知られているが、成体脳におけるBMP4の発現とその機能に関してはほとんど知られていない。それゆえ本研究においては、免疫組織化学的方法を用いて成体ラット脳におけるBMP4の発現の分布を調べた。

〔材料ならびに方法〕

1. 免疫組織化学染色に使用する抗BMP4抗体の特異性を証明するために、ELISA法およびWestern blotting法を行なった。
2. 免疫組織化学染色のために生後7週齢のWistar系雄ラットを用いた。エーテル麻酔下で4%パラホルムアルデヒド・0.2%ピクリン酸を含む0.1 Mリン酸緩衝液にて灌流固定を行ない、脳組織を摘出した。凍結後、嗅球から脊髄までを冠状断にて厚さ20 $\mu$ mに薄切し、浮遊法にて免疫組織染色(酵素抗体法、蛍光抗体法)を行なった。
3. BMP4 mRNAの発現を調べるために生後7週齢のWistar系雄ラットを用いた。エーテル麻酔下で直ちに断頭し、脳組織を摘出した。凍結後、厚さ20 $\mu$ mに薄切し、 $^{35}$ Sで標識したBMP4 mRNAに相補的なオリゴプローブを用いて*in situ* ハイブリダイゼーションを行なった。

〔結果〕

### 1. ELISA法およびWestern blotting法

ELISA法では、抗BMP4抗体は、非常に相同性の高い他のタンパクを認識せずに、BMP4タンパクのみを認識した。また、大脳皮質を用いたwestern blotting法による結果においてもシングルバンドが観察され、抗体の特異性が証明された。

### 2. 免疫組織化学染色法

BMP4の発現は、成体ラット脳において、全体的に観察された。終脳、間脳、中脳、橋、延髄、小脳

および脊髄の各領域における神経細胞の細胞体とその周囲に強い免疫反応が観察された。その他の領域では、脈絡層や脳室下帯でも強い免疫反応が見られた。また、脳梁等において、BMP4陽性細胞はアストロサイトのマーカータンパクであるグリア線維性酸性タンパクも同時に発現しており、アストロサイトがBMP4を発現していることを示していた。

### 3. *in situ* ハイブリダイゼーション法

BMP4タンパクの発現とBMP4 mRNAの発現を比較検討するためにBMP4 mRNAの発現を調べた。大脳皮質や海馬において、BMP4タンパクとBMP4 mRNAが共に強く発現しているのが観察された。また、その他の領域においても両者の発現は、ほとんど一致していた。

### 〔考察〕

BMP4に関するこれまでの研究報告は、発生初期における発現とその機能についてが大半であり、成体脳における報告はほとんどない。本研究における実験結果から、成体脳においてもBMP4が広範囲に存在することがわかり、その分布の様子から次のことが推察された。

嗅球の僧帽細胞や房飾細胞、及び梨状皮質、大脳皮質、海馬等に存在する錐体細胞、また小脳プルキンエ細胞等において、それらの細胞体でBMP4の強い免疫反応が観察された。また、樹状突起とその周囲においてもBMP4の強い免疫反応が見られた。これらの神経細胞のシナプスは高い可塑性を持つことが知られており、BMP4は長期増強や長期抑圧のような重要な現象を調節している可能性が示唆された。また、アストロサイトにもBMP4の免疫反応が見られたことから、アストロサイトから分泌されたBMP4は、局所の微小環境を調節したり、アストロサイト自身の機能に影響を与えているものと思われる。

### 〔結論〕

抗BMP4抗体を用いて成体ラット脳におけるBMP4の発現分布を調べた。脳全体の神経細胞にBMP4の強い免疫反応が見られた。また、BMP4陽性のアストロサイトも観察された。これらの結果から、成体脳の広い範囲でBMP4が機能的に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

Bone morphogenetic protein-4 (BMP4) は骨形成因子の一つであるが、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) スーパーファミリーに属し、分化、増殖、及び様々な細胞機能を調節することが知られている。BMP4は前駆体として合成された後に、細胞内でプロセッシングを受け成熟タンパクとなる。BMP4の受容体には、タイプ I (BMPRIA, BMPRIB) およびタイプ II (BMPRII) が存在し、それぞれのサブユニットはセリン/スレオニンキナーゼ領域を持っている。BMP4が結合すると、タイプ II BMPレセプターはタイプ I BMPレセプターをリン酸化して活性化し、タイプ I BMPレセプターはSMADファミリータンパクをリン酸化することにより細胞内へシグナルを伝達する。BMP4には、内因性アンタゴニスト (noggin, chordin, follistatin, neurogenesis-1) が存在し、機能の調節を受けている。発生初期における神経系の誘導にBMP4が必須で、これらのアンタゴニストがBMPの作用を調節することはよく知られているが、成体脳におけるBMP4の発現とその機能に関してはほとんど知られていない。そこで、申請者は、免疫組織化学的方法を用いて成体ラット脳におけるBMP4の分布を調べた。

申請者はまず免疫組織化学染色に使用する抗BMP4抗体の特異性を証明するために、ELISA法および

Western blotting法を行なった。ELISA法では、抗BMP4抗体は、非常に相同性の高い他のタンパクを認識せずBMP4タンパクのみを認識した。Western blotting法による結果においてもシングルバンドが観察され、抗体の特異性が証明された。免疫組織化学染色には生後7週齢のWistar系雄ラットを用いた。エーテル麻醉下で4%パラホルムアルデヒド・0.2%ピクリン酸を含む0.1 Mリン酸緩衝液にて灌流固定を行ない、脳組織を摘出した。凍結後、嗅球から脊髄までを冠状断にて厚さ20 $\mu$ mに薄切し、浮遊法にて免疫組織染色(酵素抗体法、蛍光抗体法)を行なったところ、BMP4の発現は、成体ラット脳において、全体的に観察された。次いで、BMP4タンパクの発現とBMP4 mRNAの発現を比較検討するために*in situ* ハイブリダイゼーションを行なった。生後7週齢のWistar系雄ラットを用い、エーテル麻醉下で直ちに断頭し、脳組織を摘出した。凍結後、厚さ20 $\mu$ mに薄切し、<sup>35</sup>Sで標識したBMP4 mRNAに相補的なオリゴプローブを用いて反応させた。大脳皮質や海馬において、BMP4タンパクとBMP4 mRNAが共に強く発現しているのが観察された。また、その他の領域においても両者の発現は、ほとんど一致していた。

さらに申請者は免疫組織化学染色の結果を解剖学的に詳細に解析した。その結果、終脳、間脳、中脳、橋、延髄、小脳および脊髄の各領域における神経細胞の細胞体及びその周囲に強い免疫反応性があることを明らかにした。その他の領域でも、脈絡層や脳室下帯に強い免疫反応性を発見した。また、脳梁等において、BMP4陽性細胞はアストロサイトのマーカータンパクであるグリア線維性酸性タンパク (GFAP) も同時に発現しており、アストロサイトがBMP4を発現していることを明らかにした。とくに嗅球の僧帽細胞や房飾細胞、及び梨状皮質、大脳皮質、海馬等に存在する錐体細胞、また小脳プルキンエ細胞等において、それらの細胞体と樹状突起とその周囲においてもBMP4に対する強い免疫反応性が見られた。これらの神経細胞のシナプスは高い可塑性を持つことから、BMP4は長期増強 (LTP) や長期抑圧 (LTD) のような重要な現象を調節している可能性が示唆された。また、アストロサイトにもBMP4に対する免疫反応性が見られたことから、アストロサイトから分泌されたBMP4が、局所の微小環境を調節したり、自身の機能調節する可能性を見出した。

審査委員会では、申請者がBMP4に関するこれまでの研究報告が、発生初期における発現についてが大半であり、成体脳における報告はほとんどない点に着目し、成体脳においてもBMP4が広範囲に存在することはじめて明らかにした点、およびその結果から成体脳の広い範囲でBMP4の機能的重要性に関する仮説を提唱した点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 抗マウスBMP4抗体のラットおよびヒトBMP4との交差反応性について
- 2) 使用した抗体の汎用性について
- 3) Western blottingの際に還元／非還元のテストを行ったか
- 4) neuropilでの発現はシナプス前性か後性か、またシナプス形成との関係は
- 5) 海馬、嗅球などの抑制性介在ニューロンでの発現は
- 6) BMP4は核内にも存在するか
- 7) ependymal cellにも強く発現しているか
- 8) 脳梁以外のアストロサイトでの発現は確認したか
- 9) BMP4とネスチンやnogginとの発現の関係は確認したか
- 10) BMP4以外の他のBMPの作用や発現について
- 11) 海馬や歯状回でのBMP4 mRNAの発現が低く見えるが、その意味は何か

- 12) BMP4ノックアウトのフェノタイプは
- 13) 分泌蛋白であるBMP4が樹状突起先端まで輸送される意味は
- 14) BMPレセプターの分布は確認したか
- 15) 分泌されたBMP4が細胞外に付着して免疫組織化学で染まっている可能性
- 16) 発生過程でのBMP4の作用の変化およびその時期は
- 17) BMP4の神経可塑性での役割を示唆するノックアウトマウス等の報告はあるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	福 田 敦 夫	
	副査	中 原 大 一 郎	副査 三 浦 直 行